

## PEPTIDES SYNTHETIQUES OU NATURELS LIANT LA PROTEINE PHOSPHATASE 2A, METHODE D'IDENTIFICATION ET UTILISATIONS

L'invention a trait à de nouveaux peptides, synthétiques ou naturels utiles en particulier dans le traitement des infections virales ou parasitaires ou dans le traitement de tumeurs, lesdits peptides étant d'une taille inférieure à 30 acides aminés, de préférence inférieure à 20 acides aminés, notamment de 15 à 20 acides aminés, et caractérisés en ce qu'ils lient, *in vitro*, de manière spécifique, une holoenzyme protéine phosphatase de type 2A ou l'une de ses sous-unités. L'invention a aussi trait à une méthode d'identification de tels peptides, et à leurs utilisations.

Etant donné le rôle des peptides de l'invention dans la modulation de l'activité de la protéine phosphatase 2A cellulaire, il est important de rappeler en introduction les connaissances actuelles sur les protéine phosphatases 2A, leur rôle physiologique et leurs interactions avec certaines protéines cellulaires, virales ou parasitaires.

La physiologie de la cellule est contrôlée en partie par la modulation de l'état de phosphorylation des protéines. L'état de phosphorylation des protéines cellulaires dépend de l'action antagoniste des protéine kinases qui les phosphorylent et des protéine phosphatases qui les déphosphorylent.

Les protéines phosphatases sont divisées en deux groupes principaux: les tyrosine phosphatases et les sérine/thréonine phosphatases. Les sérine/thréonine phosphatases sont classées en deux catégories selon la spécificité de leur substrat et leur sensibilité à certains inhibiteurs, les phosphatases de type 1 (PP1) et les phosphatases de type 2 (PP2). Les phosphatases de type 2 se divisent encore en différentes classes, incluant la phosphatase 2A (PP2A), la phosphatase 2B ou calcineurine dont l'activité est régulée par le calcium, et la phosphatase 2C (PP2C) dont l'activité est régulée par le magnésium.

On sait maintenant que les phosphatases de type 2A sont très conservées au cours de l'évolution et sont potentiellement impliquées dans la régulation de nombreux processus biologiques. Les enzymes PP2A ont clairement été impliquées dans la régulation de la transcription, le contrôle du cycle cellulaire ou de la transformation virale. En outre, les PP2A sont la cible de différentes protéines virales ou parasitaires, suggérant un rôle des PP2A dans les interactions hôtes-pathogènes.

Les PP2A sont des complexes oligomériques (holoenzymes) comprenant chacun, une sous-unité catalytique (C) et une ou deux sous-unités régulatrices, (A) et (B). La structure de la sous-unité (A) consiste en 15 répétitions imparfaites d'une séquence d'acides aminés conservée de 38 à 40 acides aminés, dont certaines interagissent avec les sous-unités (B) et (C). Les sous-unités (A) et (C), conservées au cours de l'évolution, constituent la structure de base de l'enzyme et sont exprimées constitutivement. Au contraire, les sous-unités (B) constituent une famille de protéines régulatrices non reliées par une structure commune et différenciellement exprimées (Cohen P. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* 1989 ; 58 : 453-508). Ainsi, Les protéine phosphatase 2A existent *in vivo* sous deux classes de forme différente : une forme dimérique (AC) et une forme trimérique (ABC). Les sous-unités (B) régulent l'activité phosphatasique et la spécificité vis-à-vis du substrat. L'existence de formes multiples de PP2A est corrélée à des fonctions distinctes et variées des PP2A *in vivo*.

Récemment, différentes protéines synthétisées par des pathogènes, et en particulier des protéines virales et parasitaires ont été impliquées dans la modulation de certaines activités spécifiques des protéine phosphatase 2A.

Différentes stratégies impliquant PP2A ont été adoptées par les virus pour faciliter leur réplication et leur survie dans la cellule hôte. Par exemple, le *parainfluenza* virus incorpore dans sa particule virale la protéine PKC  $\zeta$ .

protéine d'origine cellulaire sous le contrôle de PP2A. Ceci lui permet de perturber la phosphorylation des protéines de son hôte et de faciliter sa propre réplication (De BP, Gupta S., Barnejee AK. Cellular protein kinase C  $\xi$  regulates human parainfluenza virus type 3 replication. Proc. Natl. Acad Sci USA 1995 ; 92 :5204-8).

Plusieurs virus à ADN ayant un pouvoir transformant, tels que les *papovae* ou les adénovirus, de même que certains rétrovirus, tels que le virus de l'immunodéficience humaine type 1 (VIH-1) codent pour des protéines qui interagissent directement avec certaines PP2A de l'hôte. Tous ces virus comprennent des protéines qui bien que structurellement différentes, interagissent avec certaines holoenzymes et en modifient l'activité phosphatasique.

Il a été montré en particulier que la protéine E4orf4 des adénovirus se lie à une PP2A hétérotrimérique, et plus précisément à une sous-unité régulatrice (B), ce qui entraîne une diminution de la transcription de JunB dans la cellule infectée. Cet effet pourrait jouer un rôle important durant l'infection virale en régulant la réponse apoptotique des cellules infectées. De manière intéressante, il a aussi été montré que l'interaction de E4orf4 avec PP2A induit l'apoptose des cellules transformées d'une manière p53-indépendante (Shtrichman R. et al. Adenovirus type 5 E4 open reading frame 4 protein induces apoptosis in transformed cells. J. Virol. 1998 ; 72 : 2975-82).

Les virus générant des tumeurs de la famille des *Papovae*, incluant SV40 et le virus du polyome, induisent la transformation cellulaire. Il a été montré que PP2A interagit avec l'antigène « petit T » de SV40 ou du polyome ainsi qu'avec la protéine transformante « moyen T » du polyome. Ces interactions de protéines virales avec PP2A ont été clairement impliquées dans la transformation virale. Enfin, la régulation transcriptionnelle, un processus normalement réalisé dans la cellule par les différents facteurs se fixant spécifiquement sur des séquences régulatrices

promotrices, représente probablement le mécanisme le plus important impliqué dans le contrôle de l'expression virale par PP2A. Ainsi, il a été démontré que PP2A est un régulateur négatif de nombreux facteurs de transcription impliqués notamment dans les processus de croissance et de prolifération cellulaire, incluant AP1/SRE, NF- $\kappa$ B, Sp1 et CREB (Waszinski, B.E., Wheat W. H., Jaspers S., Peruski L.F., JR Lickteig R.L., Johnson G.L., and Klemm D.J. Nuclear protein phosphatase 2A dephosphorylates protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB Transcriptional stimulation. Mol Cell Biol. 1993 13, 2822-34). La régulation virale de ces facteurs de transcription permettrait de moduler la transcription virale.

La protéine virale de VIH-1, *Vpr*, interagit *in vitro* avec PP2A et stimule l'activité catalytique de PP2A (Tung L, *et al*, Direct activation of protein phosphatase 2A0 by HIV-1 encoded protein complex Ncp7 :vpr. FEBS Lett 1997 ; 401 : 197-201). *Vpr* peut induire l'arrêt en G2 des cellules infectées en inhibant l'activation du complexe p34cdc2-cycline B. D'autre part, *Vpr* interagit avec le facteur de transcription Sp1 et est un trans-activateur faible de la transcription de VIH-1 Sp1 dépendante. Ainsi, la protéine *Vpr* de VIH-1, qui est incorporée dans le virion, serait impliquée *in vivo* dans l'initiation de la transcription virale, une étape évidemment essentielle pour réguler l'expression du facteur de transcription Tat (un régulateur majeur de la transcription codé par le virus VIH-1).

Au contraire du rôle bien établi des protéine kinases dans les infections parasitaires, c'est seulement au cours de ces trois dernières années que les sérine/thréonine phosphatases ont commencé à être reconnues comme étant des régulateurs potentiels importants dans le domaine de la parasitologie.

Initialement, deux sérine-thréonine phosphatases, Pp $\beta$  et PfPP ont été identifiées dans *Plasmodium falciparum*. La présence d'activité phosphatasique de type 1 et de type 2A dans le parasite a été démontrée

par des études enzymologiques. Dernièrement, des enzymes parasitaires PP2A et PP2B ont été purifiées.

Les sérine/thréonine phosphatases ont été récemment étudiées chez *Theileria parva*, un autre protozoaire proche de *P. falciparum* qui parasite les bovins. Les cellules hôtes, monocytes et leucocytes, qui sont infectées par le parasite sont transformées, ce qui se traduit par une leucémie chez l'animal. Les parasites purifiés de cellules infectées par *Theileria* expriment une protéine kinase CK2 $\alpha$ . Or, la sous-unité CK2 $\alpha$  interagirait avec PP2A pour moduler positivement son activité (Hériché H., et al, Regulation of Protein Phosphatase 2A by direct interaction with casein kinase 2 $\alpha$ . Science 1997 ; 276 : 952-5). Aussi, la modulation de la PP2A via l'expression de la sous-unité CK2 $\alpha$  pourrait être à la base du blocage de deux voies de signalisation dans la cellule parasitée, celle des MAP-kinases (Chaussepied M., et al. *Theileria* transformation of bovine leukocytes : a parasite model for the study of lymphoproliferation. Res Immunol. 1996 ; 147 : 127-38) et celle de la protéine kinase B (Akt) (M. Baumgartner, M. Chaussepied, MF Moreau, A. Garcia, G. Langsley. Constitutive PI3-K activity is essential for proliferation, but not survival, of *Theileria parva* - transformed B Cells. Cellular Microbiol. (2000) 2, 329-339).

L'absence de motifs communs à l'ensemble des protéines interagissant avec PP2A empêche l'identification bio-informatique des motifs peptidiques directement impliqués dans la liaison de ces protéines avec PP2A.

Or, étant donné le rôle majeur des protéine phosphatases 2A dans les interactions virus-hôtes ou parasites-hôtes tel que résumé ci-dessus, on comprend l'intérêt d'identifier les sites de liaison des protéines virales ou parasitaires avec les holoenzymes PP2A ou l'une de l'urs sous-unités, afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour ces pathogènes, viraux ou parasitaires.

En particulier, l'identification des peptides interagissant avec PP2A permettrait de produire de nouveaux médicaments susceptibles de bloquer par inhibition compétitive les mécanismes cellulaires induits par les protéines virales ou parasitaires via leur interaction avec PP2A et en particulier les mécanismes d'infection, de prolifération des pathogènes et de transformation des cellules.

L'invention s'intéresse à des moyens d'identifier des peptides de taille réduite, liant une holoenzyme PP2A ou l'une de ses sous-unités. Au contraire des protéines natives ou domaines polypeptidiques de taille importante, des peptides de taille réduite ont l'avantage d'être aisément synthétisés, par voie chimique ou en systèmes cellulaires, avec un rendement important et un coût réduit. Les peptides de l'invention sont en outre plus stables et plus facilement transférés dans le cytoplasme ou dans le noyau des cellules à l'aide de vecteurs appropriés, en vue d'une utilisation thérapeutique.

L'invention découle de la démonstration qu'il est possible d'identifier des peptides, d'une taille inférieure à 30 acides aminés, et notamment des peptides d'une taille inférieure à 20 acides aminés interagissant avec une holoenzyme PP2A ou l'une de ses sous-unités.

En particulier, les inventeurs ont montré que l'utilisation de la technique des « SPOT synthesis » décrites par Frank et Overwing (*Methods in Molecular Biology*, 1996, vol. 66 : 149-169, Epitope Mapping Protocols edited by : G.E. Morris Humana Press Inc., Totowa NJ) permet d'identifier les sites de liaison des protéines interagissant avec une holoenzyme PP2A ou l'une de ses sous-unités.

Les inventeurs ont par exemple identifié des peptides d'une taille inférieure à 20 acides aminés, interagissant *in vitro* avec l'holoenzyme PP2A purifiée ou l'une de ses sous-unités, lesdits peptides étant dérivés de la protéine Vpr de VIH-1 ou de la protéine CK2 $\alpha$  du parasite *T. parva*. Des antagonistes dérivés de ces peptides et sélectionnés parce qu'ils inhibent

l'interaction des protéines virales ou parasitaires avec une holoenzyme particulière de PP2A pourraient ainsi constituer de nouveaux agents antitumoraux, antiviraux ou antiparasitaires.

L'invention porte sur une méthode d'identification d'un peptide dont la séquence est issue d'une protéine virale, parasitaire ou cellulaire, ledit peptide liant spécifiquement une holoenzyme protéine phosphatase de type 2A ou l'une de ses sous-unités, ladite méthode comprenant les étapes consistant à :

- a) déposer sous forme de spots, sur un support, des peptides dont la séquence est issue d'une protéine virale, parasitaire ou cellulaire, chaque spot correspondant au dépôt d'un peptide de séquence définie,
- b) mettre en contact le support solide avec une solution contenant une holoenzyme protéine phosphatase 2A ou l'une de ses sous-unités dans des conditions permettant aux peptides présents sur le support, de lier l'holoenzyme ou l'une de ses sous-unités, et,
- c) à identifier sur le support solide, le peptide sur lequel se fixe la protéine phosphatase 2A ou l'une de ses sous-unités.

Selon l'étape a), différents peptides sont déposés sur un support solide à des positions définies (« spot »), chaque position correspondant à une séquence peptidique spécifique et l'ensemble formant ainsi un réseau de peptides (« array ») à deux dimensions. Différentes méthodes de préparation de tels réseaux ont été décrites récemment (pour revue, Figeys et Pinto, 2001 *Electrophoresis* 22 : 208-216 ; Walter et al., 2000 *Curr Opin Microbiol* 3 : 298-302). L'ensemble de ces méthodes comprend en général la fixation covalente de peptides sur un support, en particulier à l'aide de lieurs (linkers) chimiques. A titre d'exemple, l'homme du métier pourra notamment se reporter à la technique des « SPOT synthesis » consistant à synthétiser directement sur une membrane de cellulose, des peptides

comprenant jusqu'à 20 résidus (Frank et Overwing, *Methods in Molecular Biology*, 1996, vol. 66 : 149-169, Epitope Mapping Protocols edited by : G.E. Morris Humana Press Inc., Totowa NJ).

5 De manière générale, toute méthode peut être utilisée dès lors que celle-ci permet l'obtention d'un réseau de peptides déposés sur un support solide, utilisable pour détecter des interactions spécifiques entre les peptides déposés et des composés particuliers.

10 De façon très préférée, l'ensemble des séquences de peptides déposés recouvre la séquence complète de la protéine virale, parasitaire ou cellulaire dont ces séquences sont issues. Ainsi, le procédé permet de tester en une seule étape la séquence complète d'une protéine donnée, celle-ci étant « sectionnée » en un nombre fini de peptides, de séquences généralement chevauchantes.

15 Dans un mode de réalisation préféré, les peptides déposés sous forme de spot sont d'une taille inférieure à 20 acides aminés, et mieux, d'une taille inférieure à 15 acides aminés.

Dans un autre mode de réalisation particulier, les peptides sont déposés sur une membrane de cellulose.

20 Le réseau ainsi obtenu est mis en contact à l'étape b), avec une holoenzyme protéine phosphatase de type 2A ou l'une de ses sous-unités.

25 Par « holoenzyme protéine phosphatase de type 2A », il faut comprendre tout complexe dimérique (AC) ou hétérotrimérique (ABC), purifié d'un extrait cellulaire ou reconstitué après purification des deux sous-unités (A) et (C) d'une protéine phosphatase de type (2A) et le cas échéant d'une sous-unité (B). Les protéine phosphatases de type (2A) sont de préférence issues de mammifères.

30 Les supports sont incubés par exemple dans une solution tampon comprenant les protéine phosphatase purifiées ou l'une de leurs sous-unités purifiées. Une solution tampon utilisable est I TBS (TRIS BORATE) contenant 5% de régilaït écrémé t 3% de BSA.

Le peptide sur lequel se fixe l'holoenzyme protéine phosphatase de type 2A est identifié en général par le marquage direct ou indirect de la protéine phosphatase et l'identification des spots au niveau desquels s'est fixé la protéine marquée. La fixation de la PP2A ou l'une de ses sous-unités au niveau de l'un des spots de peptides peut ainsi être révélée en particulier à l'aide d'antisérums, selon les techniques classiquement utilisées pour le Western Blot ou le test ELISA en phase solide, après incubation du support contenant le réseau de peptides avec un anticorps dirigé contre les sous-unités (A) ou (B) ou (C) ou un mélange d'anticorps dirigé contre les sous-unités (A), (B) ou (C) de PP2A.

L'application de la méthode de l'invention définie ci-dessus conduit à l'identification de peptides, notamment utiles dans le traitement de certaines infections virales ou parasitaires, d'une taille inférieure à 30 acides aminés, voire inférieure à 20 acides aminés, lesdits peptides étant capables de lier *in vitro* une holoenzyme protéine phosphatase de type 2A ou l'une de ses sous-unités.

Dès lors, en utilisant ses connaissances générales dans le domaine de la synthèse peptidique, l'homme du métier peut produire des peptides, dérivés des fragments de peptides identifiés par la méthode de l'invention présentant les propriétés avantageuses décrites ci-dessus.

Par conséquent, l'invention vise un peptide, naturel ou synthétique, d'une taille inférieure à 30 acides aminés, de préférence inférieure à 20 acides aminés, caractérisé en ce qu'il lie *in vitro*, de manière spécifique, une holoenzyme protéine phosphatase de type 2A ou l'une de ses sous-unités, (A), (B) ou (C). Par liaison spécifique, il faut comprendre que le peptide est capable d'inhiber de manière compétitive la liaison d'une protéine d'origine virale ou parasitaire avec des PP2A.

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, le peptide d l'invention est caractérisé en ce qu'il s'agit d'un fragment d'une protéine

virale, parasitaire ou cellulaire, ladite protéine liant *in vitro* une protéine phosphatase de type 2A ou l'une de ses sous-unités, ou d'une séquence se distinguant du fragment de protéine précédent par substitution ou délétion d'acides aminés, ladite séquence distincte conservant néanmoins les propriétés de liaison à une protéine phosphatase de type 2A ou l'une de ses sous-unités. De préférence, le nombre d'acides aminés substitués ou supprimés dans la séquence distincte par rapport à la séquence initiale n'excède pas 20%, et mieux 10% du nombre d'acides aminés constituant la séquence initiale. De façon préférée, seuls les acides aminés dont la délétion n'affecte pas les propriétés de liaison *in vitro* du peptide à la PP2A sont substitués ou supprimés.

En particulier, une séquence distincte est une séquence peptidique augmentant l'affinité de liaison à la protéine phosphatase de type 2A ou l'une de ses sous-unités par rapport à la séquence dont elle dérive. Une autre séquence distincte telle que définie plus haut est une séquence peptidique homologue à une séquence peptidique identifiée initialement. Par séquence peptidique homologue, on entend dans la présente invention, une séquence dérivée d'une protéine d'une autre espèce que la séquence peptidique identifiée initialement, et dont la séquence primaire peut être alignée avec la séquence peptidique identifiée initialement à l'aide d'un programme d'alignement optimal classiquement utilisé, tel que le programme BESTFIT (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, GCG). En particulier, une séquence A sera considérée comme homologue à une séquence B si lesdites séquences A et B présentent au moins 50% d'identité, de préférence 75% d'identité, après alignement des séquences à l'aide d'un programme d'alignement optimal tel que le programme BESTFIT. De manière encore préférée, deux séquences sont aussi considérées homologues si les séquences sont quasi-identiques à l'exception de quelques résidus pouvant représenter 10 à 20% de variabilité sur la séquence totale. Par ailleurs l

acides aminés de même fonction chimique (telles que par exemple, Arg et Lys) sont considérés comme équivalents. Les peptides à analyser pour leur liaison avec une PP2A ou l'une de ses sous-unités, sont en général choisis parmi des fragments de protéines virales, parasitaires ou cellulaires, lesquels protéines ont été montrées interagir *in vivo* ou *in vitro* avec une protéine phosphatase de type 2A.

De telles protéines virales, parasitaires ou cellulaires sont en particulier choisies parmi l'une des protéines suivantes : antigène t de SV40 ou de polyôme, antigène moyen t de polyôme, sous unité de PP2A de type B (B, B', B''), CK2 $\alpha$ , CaMIV, p70S6-kinase, Pak1/Pak3, Tap42/ $\alpha$  4, PTPA, Set/11/12-PP2A, E4orf4, *tau*, *Vpr* ou CD28, CCXR2 (récepteur de chemokine).

Un peptide de l'invention préféré est un fragment de la protéine CD28, et notamment les peptides constitués par les séquences PRRPGPTRKHY (SEQ ID NO :132) et (PRRPGPTRK)<sub>2</sub> (SEQ ID NO :133) correspondant respectivement aux peptides nommés FD2 et FD3 dont la capacité de pénétration intracellulaire et leurs effets sur la viabilité des cellules sont décrits ci-après dans la partie expérimentale. Sont également visées dans la présente invention, les séquences peptidiques se distinguant du fragment de protéine précédent, par substitution ou délétion d'acides aminés, lesdites séquences distinctes conservant néanmoins les propriétés de liaison à la protéine phosphatase de type 2A ou l'une de ses sous-unités.

Un peptide de l'invention particulièrement préféré est un fragment de la protéine *Vpr* du virus VIH, en particulier un fragment de la protéine *Vpr* du virus VIH-1 ou VIH-2, ou une séquence se distinguant du fragment de protéine précédent par substitution ou délétion d'acides aminés, ladite séquence distincte conservant néanmoins les propriétés de liaison à la protéine phosphatase de type 2A ou l'une de ses sous-unités. L'invention ne comprend pas le peptide, fragment de la protéine *Vpr* ayant la séquence

suivante : LFIHFRIGCQHRSRIGITRRRRVRDGSSRP\* divulguée dans la base de données EMBL, numéro d'accèsion P89821. En revanche, l'utilisation dudit peptide dans le cadre des applications décrites ci-après, fait partie de la présente invention.

5 On citera notamment, à titre d'exemple de peptides dérivés d'une protéine qui interagit avec la protéine phosphatase de type 2A, dérivé de la protamine, le peptide de séquence RRRRRRRSRGRRRTY (SEQ ID NO :140, nommé FD8) ou une séquence se distinguant de SEQ ID NO :140 par substitution ou délétion d'acides aminés, ladite séquence  
10 distincte conservant néanmoins les propriétés de liaison à la protéine phosphatase de type 2A ou l'une de ses sous-unités.

De manière encore préférée, un peptide selon l'invention est caractérisé en ce qu'il est inclus dans l'une des séquences suivantes :

a) VEALIRILQQLLFIHFRI (SEQ ID NO :1),

15 b) RHSRIGIIQQRRTNG (SEQ ID NO:2), ou,

c) une séquence se distinguant de SEQ ID NO :1 ou SEQ ID NO :2 par substitution ou délétion d'acides aminés, ladite séquence distincte conservant néanmoins les propriétés de liaison pour la protéine phosphatase de type 2A ou  
20 l'une de ses sous-unités.

Un peptide particulièrement préféré selon l'invention est un fragment du peptide SEQ ID NO :2, ledit fragment consistant en, ou comprenant le peptide de séquence RHSRIG (SEQ ID NO :135) nommé FD9 dont la capacité de pénétration intracellulaire et l'effet sur la viabilité des cellules ont été décrits ci-après dans la partie expérimentale.

25 L'invention concerne également un composé à ossature polypeptidique contenant un peptide selon l'invention tel que défini ci-dessus, ledit composé étant d'un poids moléculaire compris entre 10 et 150 Kdaltons et ayant la capacité de lier la protéine phosphatase 2A.

L'invention concerne également un polypeptide caractérisé en ce qu'il est constitué de la répétition d'un peptide selon l'invention.

Des exemples de tels polypeptides sont notamment des polymères du peptide RHSRIG et en particulier, le dimère (RHSRIG)<sub>2</sub> (SEQ ID NO :136) ou encore le trimère (RHSRIG)<sub>3</sub> (SEQ ID NO :137), respectivement nommés FD10 et FD11 dont la capacité de pénétration intracellulaire et l'effet sur la viabilité des cellules ont été décrits ci-après dans la partie expérimentale.

Parmi les peptides de séquences se distinguant de SEQ ID NO :1 ou SEQ ID NO :2 par substitution ou délétion d'acides aminés, et entrant dans le cadre de l'invention, on citera plus particulièrement les peptides dont la séquence est incluse dans l'une des séquences de la protéine *Vpr* des différents variants du type VIH-1, VIH-2 et de SIV, et correspondant aux séquences homologues chez ces variants de SEQ ID NO :1 ou SEQ ID NO :2.

On peut citer notamment les séquences VEALIRILQQLL (SEQ ID NO : 6), ALIRILQQLLFI (SEQ ID NO : 7), IRILQQLLFIHF (SEQ ID NO : 8), ILQQLLFIHFR (SEQ ID NO : 9), RHSRIGIIQRRR (SEQ ID NO : 10), SRIGIIQRRRTR (SEQ ID NO : 11) et IGIIQRRRTRNG (SEQ ID NO : 12) correspondant aux dodécapeptides identifiés comme liant la sous-unité A de PP2A.

Une séquence selon l'invention se distinguant de SEQ ID NO :2 par délétion ou substitution d'acides aminés est en particulier la séquence RHSRIGVTRQRRARNG (SEQ ID NO :139), également nommée FD13 dans la partie expérimentale présentée ci-après.

Un peptide préféré selon l'invention est un peptide choisi parmi l'une des séquences SEQ ID NO :1 ou SEQ ID NO :2 et caractérisé en ce que son administration induit l'apoptose des cellules tumorales.

Une méthode de sélection de peptides susceptibles d'induire l'apoptose des cellules tumorales peut être réalisée par exemple au moyen du test de viabilité MTT décrit dans la partie expérimentale.

Un autre mode de réalisation préféré de l'invention fournit un peptide caractérisé en ce qu'il dérive d'un fragment de la protéine CK2 $\alpha$ . En particulier, le peptide, naturel ou synthétique, est caractérisé en ce qu'il dérive d'un fragment de la protéine CK2 $\alpha$  du parasite *Theileria parva*.

De manière encore préférée, un peptide selon l'invention est caractérisé en ce qu'il est inclus dans l'une des séquences suivantes :

- a) RKIGRGKFSEVFEG (SEQ ID NO :3),
- b) TVTKDKCVIKILKPVKKKKIKREIKILQNL (SEQ ID NO: 4),
- c) KILRLIDWGLAEFYHP (SEQ ID NO: 5),
- d) Une séquence homologue de SEQ ID NO :3, SEQ ID NO :4 ou SEQ ID NO :5 dérivée de *P. falciparum* ou *leishmania*, ou,
- e) une séquence se distinguant des séquences mentionnées ci-dessus par substitution ou délétion d'acides aminés, ladite séquence distincte conservant néanmoins les propriétés de liaison à la protéine phosphatase 2A ou l'une de ses sous-unités et notamment la séquence TVTKDKCVIKILKPVKKKKIKREIKILQNL (SEQ ID NO 142).

Parmi les peptides se distinguant des séquences SEQ ID NO : 3, NO : 4 ou NO :5, on peut citer notamment les séquences du site 1 (RKIGRGKFSEVFEG) (SEQ ID NO : 3), et notamment le peptide de séquence RKIGRGKFSEVF et le peptide de séquence IGRGKFSEVFEG ou les séquences du site 2 (TVTKDKCVIKILKPVKKKKIKREIKILQNL) (SEQ ID NO : 4) notamment les peptides suivants :

- TVTKDKCVIKIL (SEQ ID NO : 13),
- TKDKCVIKILKP (SEQ ID NO : 14),
- DKCVIKILKPVK (SEQ ID NO: 15),
- CVIKILKPVKKK (SEQ ID NO : 16),

IKILKPVKKKKI (SEQ ID NO : 17),  
ILKPVKKKKIKR (SEQ ID NO : 18),  
KPVKKKKIKREI (SEQ ID NO : 19),  
VKKKKIKREIKI (SEQ ID NO : 20),  
5 KKKIKREIKILQ (SEQ ID NO : 21),  
KIKREIKILQNL (SEQ ID NO : 22),

et enfin les séquences du site 3 KILRLIDWGLAEFTHP (SEQ ID NO : 5)  
soit le peptide de séquence KILRLIDWGLAE (SEQ ID NO : 23), le peptide  
de séquence LRLIDWGLAEFY (SEQ ID NO : 24), ou le peptide de  
séquence LIDWGLAEFYHP (SEQ ID NO : 25).

Un exemple de peptide selon l'invention comprenant une séquence  
homologue à *T. parva* du site 3 de la protéine CK2 $\alpha$  chez *P. falciparum* est  
le peptide RQKRLI (SEQ ID NO : 141). L'invention porte également sur des  
polymères du peptide RQKRLI et notamment le trimère (RQKRLI)<sub>3</sub> (SEQ  
15 ID NO : 134) nommé FD7 dans la partie expérimentale.

De préférence, l'invention porte sur un peptide dérivé de la protéine  
CK2 $\alpha$  du parasite *Theileria parva* caractérisé en ce que son administration  
réduit le développement parasitaire.

Un autre mode de réalisation des peptides de l'invention est  
caractérisé en ce que les peptides sont dérivés de la protéine tau. La  
séquence tau présente un motif correspondant au site de liaison de la  
protéine E4orf4 d'adénovirus. Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, la  
protéine tau est régulée par la protéine phosphatase 2A. De tels peptides  
seraient donc utiles dans le traitement de la maladie d'Alzheimer.

25 Les peptides identifiés par la méthode de l'invention sont  
particulièrement utiles dans le traitement de certaines tumeurs, de  
certaines infections virales ou parasitaires. L'homme du métier peut  
sélectionner, à l'aide de tests de compétition de liaison, de nouveaux  
peptides, dérivés de séquences identifiées selon la méthode de  
30 l'invention, lesdits peptides inhibant de manière compétitive la liaison de la

protéine native dont il dérive avec une holoenzyme PP2A ou l'une de ses sous-unités.

Ainsi, l'invention concerne également un peptide naturel ou synthétique, tel que défini plus haut, caractérisé en ce qu'il inhibe de manière compétitive, l'interaction de la protéine native dont il dérive avec une holoenzyme PP2A ou l'une de ses sous-unités.

Les peptides selon l'invention, pour être efficace *in vivo* dans le traitement de certaines tumeurs ou certaines infections virales ou parasitaires, peuvent être couplés à un vecteur capable de transférer ledit peptide dans une cellule eucaryote. Cependant, il est possible comme discuté ci-dessous que les peptides selon l'invention possèdent eux-mêmes la capacité de pénétrer dans les cellules et par conséquent ne nécessitent pas l'adjonction d'un vecteur.

L'invention porte naturellement sur les moyens permettant la synthèse des peptides de l'invention. En particulier, l'invention porte sur un polynucléotide caractérisé en ce que sa séquence consiste en la séquence codante d'un peptide selon l'invention. Des polynucléotides préférés sont les polynucléotides dont la séquence est choisie parmi l'une des séquences suivantes

SEQ IDs NO : 26

(5'GTGGAAGCCTTAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATTCATT  
CAGAATT),

NO : 27

(5'CGACATAGCAGAATAGGCATTATTCAACAGAGGAGAACAAGAAATG  
GA),

NO : 28

(5'-AGGAAGATCGGAAGAGGGAAGTTCAGTGAAGTTTTTGAGGGA),

NO : 29

(5'ACAGTAACGAAGGATAAATGCGTAATAAAAATCCTAAAGCCTGTAAA  
GAAGAAGAAAATCAAGAGAGAGATTAAGATTCTACAGAACCTA),

ou NO : 30

5

(5'AAAATACTAAGGCTAATTGACTGGGGATTAGCTGAGTTTTACCACCC  
A), codant respectivement les peptides NO : 1-5.

L'invention concerne également les polynucléotides de séquences  
complémentaires à l'une des séquences SEQ ID NO :26-30 et les  
10 séquences hybridant dans des conditions stringentes auxdits  
polynucléotides.

Par « conditions stringentes », on entend les conditions qui  
permettent l'hybridation spécifique de deux séquences d'ADN simple brin à  
environ 65°C par exemple dans une solution de 6 x SSC, 0,5% SDS, 5X  
15 Denhardt's solution et 100 µg d'ADN carrier non spécifique ou toute autre  
solution de force ionique équivalente et après un lavage à 65°C, par  
exemple dans une solution d'au plus 0,2 x SSC et 0,1% SDS ou toute autre  
solution de force ionique équivalente. Les paramètres définissant les  
conditions de stringence dépendent de la température à laquelle 50% des  
20 brins appariés se séparent ( $T_m$ ). Pour les séquences comprenant plus de  
30 bases,  $T_m$  est définie par la relation :  $T_m = 81,5 + 0,41 (\%G + C) + 16,6 \log (\text{concentration en cations}) - 0,63 (\% \text{ formamide}) - (600/\text{nombre de bases})$ . Pour les séquences de longueur inférieure à 30  
bases,  $T_m$  est définie par la relation :  $T_m = 4 (G+C) + 2(A+T)$ . Les  
25 conditions de stringence sont également définies selon les protocoles  
décrits dans Sambrook *et al.*, 2001 (Molecular Cloning : A laboratory  
Manual, 3rd Ed., Cold Spring Harbor, laboratory press, Cold Spring Harbor,  
New York).

Il peut être avantageux de synthétiser un polypeptide comprenant la répétition des motifs peptidiques identifiés par le procédé de l'invention. Par conséquent, l'invention porte sur un polynucléotide caractérisé en ce qu'il consiste en un multimère du polynucléotide codant pour un peptide de l'invention. L'invention porte également sur un polypeptide caractérisé en ce qu'il est constitué de la répétition d'un peptide selon l'invention.

L'invention porte également sur un vecteur d'expression cellulaire, caractérisé en ce qu'il comporte un polynucléotide tel que défini plus haut et des séquences régulatrices permettant l'expression d'un peptide selon l'invention dans une cellule hôte.

L'invention vise également la méthode de préparation d'un peptide tel que défini selon l'invention, comprenant la transformation d'un hôte cellulaire à l'aide d'un vecteur d'expression cellulaire tel que défini plus haut, suivi de la mise en culture de l'hôte cellulaire ainsi transformé, et la récupération du peptide dans le milieu de culture.

L'invention porte en outre sur un antisérum ou immunosérum ou, un anticorps polyclonal purifié ou un anticorps monoclonal caractérisé en ce que ledit anticorps ou ledit antisérum ou immunosérum est capable de lier de façon spécifique un peptide selon l'invention.

Des anticorps spécifiquement dirigés contre les peptides identifiés par le procédé de l'invention sont obtenus, par exemple par immunisation d'un animal après injection d'un peptide selon l'invention, et récupération des anticorps produits. Un anticorps monoclonal peut être obtenu selon les techniques connues de l'homme du métier telle que la méthode des hybridomes décrites par Kohler et Milstein (1975).

Les anticorps obtenus, spécifiquement dirigés contre des cibles de la protéine phosphatase 2A trouvent leur application en particulier dans l'immunothérapie. Ils peuvent par exemple servir d'antagonistes de protéines virales ou parasitaires dirigés contre la protéine phosphatase 2A afin de bloquer le développement viral ou parasitaire.

De même, les polynucléotides codant les peptides de l'invention peuvent être directement transférés au noyau de cellules cibles, le cas échéant à l'aide de vecteurs appropriés, afin de permettre l'expression *in vivo* des peptides correspondants, lesdits peptides étant susceptibles de bloquer par inhibition compétitive une interaction spécifique entre la protéine phosphatase 2A et la protéine virale ou parasitaire dont ils dérivent.

Ainsi, l'invention porte sur une composition pharmaceutique comprenant un des éléments choisis parmi un polynucléotide selon l'invention ou un anticorps selon l'invention.

L'invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant l'un des peptides de l'invention en combinaison avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

L'invention vise en outre une utilisation d'un peptide de l'invention défini plus haut, dans la préparation d'un médicament utile dans le traitement d'une infection virale ou parasitaire.

L'invention vise préférentiellement l'utilisation d'un peptide dont la séquence dérive d'un fragment de la protéine *Vpr*, tel que défini plus haut, dans la préparation d'un médicament apte à inhiber l'infection au VIH.

Les peptides de l'invention peuvent être avantageusement choisis de manière à stimuler l'induction de l'apoptose liée à l'activation de la protéine phosphatase 2A cellulaire. Ainsi, l'invention concerne également l'utilisation d'un peptide selon l'invention, tel que défini plus haut, dans la préparation d'un médicament apte à induire l'apoptose de cellules cibles, et en particulier de cellules tumorales.

Un autre aspect préféré de l'invention concerne l'utilisation d'un peptide dont la séquence dérive d'un fragment de la protéine  $CK2\alpha$ , dans la préparation d'un médicament apte à inhiber l'infection parasitaire. Plus particulièrement, l'invention vise l'utilisation d'un peptide dans la préparation d'un médicament utile dans le traitement du paludisme.

L'infection virale ou parasitaire se traduit par une expression spécifique des protéines comprenant les séquences de peptides de l'invention. Les séquences codant les peptides de l'invention peuvent donc être utilisées comme sonde pour détecter, de manière spécifique, à partir  
5 d'ARN extrait d'un échantillon biologique d'un patient, une infection virale ou parasitaire spécifique.

De même, un anticorps selon l'invention peut être utilisé pour reconnaître spécifiquement les séquences peptidiques contenues dans les protéines virales ou parasitaires exprimées lors de l'infection.

10 Ainsi, l'invention porte donc sur l'utilisation d'un polynucléotide selon l'invention ou d'un anticorps selon l'invention dans le diagnostic *in vitro* de pathologies parasitaires ou virales.

L'invention porte également sur la sélection et l'utilisation d'un peptide liant la protéine phosphatase 2A, et capable de pénétrer à  
15 l'intérieur des cellules.

Un exemple d'un tel peptide est illustré par le peptide FD6 (SEQ ID NO :20) dérivé de la protéine CK2 $\alpha$  de *T. parva*. Il a en effet été montré dans la présente invention que la présence de ce peptide dans la cellule n'affecte pas la viabilité de cellules de mammifères cultivées ou maintenues  
20 en survie.

La partie expérimentale qui suit illustre une application de la méthode d'identification des peptides de l'invention à l'identification de peptides issus de la protéine *Vpr* du VIH-1 et de la protéine CK2 $\alpha$  du parasite *Theileria parva*. L'invention porte également sur la sélection et  
25 l'utilisation d'un peptide liant la protéine phosphatase 2A et éventuellement capable de pénétrer à l'intérieur de la cellule, ledit peptide permettant de cibler et de mettre en contact avec la protéine phosphatase 2A intracellulaire une molécule capable de réguler l'activité de la protéine phosphatase 2A.

### DESCRIPTION DES FIGURES

**Figure 1** : Criblage d'une membrane contenant des peptides recouvrant la séquence Vpr de HIV-1 avec la sous-unité structurale A de PP2A (A) et l'holoenzyme PP2A1(B).

Le recouvrement de la séquence des quatre peptides 54-57 définit la séquence du site 2 VEALIRILQQLFIHFRI (SEQ ID NO : 1)

Peptide 54 : VEALIRILQQLL

Peptide 55 : ALIRILQQLFI

Peptide 56 : IRILQQLFIHF

Peptide 57 : ILQQLFIHFRI

Le recouvrement de la séquence des trois peptides 64 à 66 définit la séquence du site 1 RHSRIGIIQQRTRNG (SEQ ID NO : 2)

Peptide 64 : RHSRIGIIQQR

Peptide 65: SRIGIIQQRTR

Peptide 66 : IGIIQQRTRNG

**Figure 2** : Criblage d'une membrane contenant des peptides recouvrant la séquence de CK2 $\alpha$  de *Theileria* avec (A) la sous-unité structurale A de PP2A et (B) l'holoenzyme PP2A1.

Le recouvrement de la séquence des deux peptides définit la séquence du site 1 RKIGRGKFSEVFEG (SEQ ID NO : 3)

Peptide 66 : RKIGRGKFSEVF

Peptide 67 : IGRGKFSEVFEG

Le recouvrement de la séquence des dix peptides 74-83 définit la  
séquence du site 2 TVTKDKCVIKILKPVKKKKIKREIKILQNL  
(SEQ ID NO : 4)

Peptide 74 : TVTKDKCVIKIL

5 Peptide 75 : TKDKCVIKILKP

Peptide 76 : DKCVIKILKPVK

Peptide 77 : CVIKILKPVKKK

Peptide 78 : IKILKPVKKKKI

Peptide 79 : ILKPVKKKKIKR

10 Peptide 80 : KPVKKKKIKREI

Peptide 81 : VKKKKIKREIKI

Peptide 82 : KKKIKREIKILQ

Peptide 83 : KIKREIKILQNL

15 Le recouvrement de la séquence des trois peptides définit la  
séquence du site 3 KILRLIDWGLAEFTHP (SEQ ID NO : 5)

Peptide 129 : KILRLIDWGLAE

Peptide 130 : LRLIDWGLAEFY

Peptide 131 : LIDWGLAEFYHP

20 Figure 3 : La figure 3 est un histogramme représentant les valeurs de  
pénétration intracellulaires obtenues à l'aide du test de pénétration  
cellulaire pour les peptides cités dans le tableau 3

25 Figure 4 : La figure 4 illustre les effets de différents peptides sur la viabilité  
des cellules Héla évaluée à l'aide du test de viabilité MTT.

La viabilité des cellules Héla (exprimée en pourcentage par rapport à  
la population initiale) a été testée en présence de concentrations  
croissantes, respectivement de peptides FD8 (4A), FD13/FD14 (4B) et  
FD11/FD12 (4C).

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

### **A. Matériels et méthodes**

#### **A.1 Les protéines PP2A purifiées**

La protéine trimérique PP2A1 a été purifiée à homogénéité à partir de cerveau de porc.

Une sous-unité structurale recombinante de PP2A a été exprimée chez *E. coli* et purifiée selon le protocole décrit par Cohen et al. (Cohen P., Alemany S, Hemmings BA, Resink TJ, Stralfors P., Tung HY. Protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2A from rabbit skeletal muscle. Methods Enzymol. 1988 159, 390-408), ou celui décrit par Bosch et al., (Bosch M, Cayla X, Van Hoof C, Hemmings BA, Ozon R., Merlevede W, Goris J. The PR55 and PR65 subunits of protein phosphatase 2A from *Xenopus laevis*. Molecular cloning and developmental regulation of expression. Eur J. Biochem. 1995 230,1037-45).

#### **A.2 -Méthode d'identification des sites de liaison de Vpr de VIH et CK2 $\alpha$ de *Theileria parva* (*T.parva*) avec PP2A**

Des peptides de liaison dérivés des protéines CK2 $\alpha$  (codée par le protozoaire *T. parva*) ou Vpr (codée par le virus VIH-1) avec PP2A ont été identifiés en utilisant la technique des « peptides spot » précédemment décrite (Frank et Overwing. (1996). *Meth. Mol. Biol.* 66,149-169).

La méthode a consisté à synthétiser *in situ* sur une membrane de cellulose, à des positions définies, des dodécapeptides, dont l'ensemble des séquence recouvre la totalité de la séquence de la protéine d'intérêt (Vpr ou CK2 $\alpha$ ). Les peptides de deux spots consécutifs sur la membrane, se chevauchent avec un décalage de deux acides aminés.

Soixante huit (68) dodécapeptides recouvrant toute la séquence de la protéine Vpr de VIH-1 et deux cent cinq (205) dodécapeptides recouvrant la séquence de la protéine CK2 $\alpha$  de *Theileria* ont été synthétisés et liés de façon covalente à des membranes de cellulose.

5            Chaque membrane ainsi préparée est d'abord saturée 1 heure à température ambiante avec du TBS contenant 5% de régilait écrémé et 3% de BSA puis incubée une nuit dans le même tampon en présence de 4 $\mu$ g/ml de protéine purifiée (sous-unité A de PP2A ou holoenzyme PP2A1).  
10           L'interaction spécifique de chaque protéine purifiée (respectivement la sous-unité structurale A ou l'holoenzyme trimérique PP2A1) avec une séquence peptidique est révélée, comme un western blot, après incubation de la membrane avec un anticorps dirigé contre la protéine structurale A (Figures 1A et 2A) et avec un mélange d'anticorps reconnaissant les protéines A,B, et C de PP2A (Figures 1B et 2B).

15           Les membranes sont lavées 5 fois 15 minutes avec un tampon classique TBST (TBS + TWEEN), utilisé pour l'incubation puis à nouveau incubées 1 heure à température ambiante avec un second anticorps (couplé à la peroxydase). Enfin, les membranes sont lavées 5 fois 15 minutes avec le tampon TBST et révélées.

## 20           **A3    Test de pénétration cellulaire**

### 1-    **Cellules**

Nous avons analysé la lignée Hela qui est dérivée d'un carcinome Cervical humain.

### 2-    **Dosages quantitatifs des peptides internalisés**

25           *Tampon de lyse :*

0,1 M tampon Tris pH 8 contenant 0,5 % NP40.

*Tampon OPD :*

25,7 ml dibasic sodium phosphate 0,2 M + 24,3 ml acide citrique 0,1 M + 50 ml d'eau distillée ; ajuster pH 5,0.

*Complexes peptides biotinylés-avidine. :*

- 5 4 moles de peptides sont incubées avec 1 mole d'avidine-péroxydase. 20 minutes à température ambiante

*-Analyse de la pénétration intracellulaire des divers peptides dans la cellule Hela*

- 10 Les cellules Hela ( $10^4$  pour 100 l) sontensemencées dans des plaques de 96 puits (fonds plats) avec du milieu complet DMEM en présence de 2,5 % pénicilline/ampicilline et de 10 % sérum de veau foetal. Après une nuit d'incubation à 37°C dans une étuve à CO<sub>2</sub> (5%), on ajoute différentes dilutions de complexes (peptides biotinylés-avidine peroxydase). Après 4 heures d'incubation le surnageant est aspiré, et les cellules lavées 3 fois
- 15 avec du PBS, trypsinées et reprises pour numération dans 1 ml de PBS. Après numération, les cellules sont reprises dans 300 µl de tampon de lyse.

*-Mesure de l'activité peroxydase*

- 20 Dans une plaque ELISA 96 trous on incube 50 µl de tampon OPD avec 50 µl de tampon lyse ou 50 µl de lysat cellulaire (en général on effectue différentes dilutions successives (au 1/2)). Pour révéler, on ajoute (à l'obscurité ) 50 µl de la solution d'OPD. La réaction (environ 10min) est arrêtée avec 100 µl d'HCL 1N.

*-Analyse du résultat*

- 25 L'activité peroxydase est déterminée par lecture à 490 nm au lecteur ELISA (filtre de référence à 620 nm) et la quantité de peroxydase dans les lysats est calculée d'après la courbe de référence puis rapportée au même nombre de cellules ( $10^3$  ou  $10^4$ ) :

Molécules de peptides =  $(6 * 10^{23} / \text{PM du peptide}) * \text{ng de PO} * 10^{-9}$ .

#### **A4 Test de viabilité cellulaire**

Les cellules Hela ( $10^4$  pour 100 $\mu$ l) sontensemencées dans des plaques de 96 puits (fonds plats) avec du milieu complet DMEM contenant 2,5 % pénicilline/ampicilline et 10 % sérum de veau foetal. Après une nuit d'incubation à 37°C dans une étuve à CO<sub>2</sub>, et les cellules sont cultivées en présence de différentes concentrations de peptides. Après 72h d'incubation, le milieu contenant les peptides est aspiré et le MTT à 0,5 mg/ml (dilué dans du DMEM seul) est ajouté à raison de 100  $\mu$ l par puits. L'incubation est réalisée dans le noir à 37°C pendant 30 minutes puis le MTT est aspiré et 50  $\mu$ l de DMSO est ajouté dans tous les puits. Il faut attendre une dizaine de minutes pour la lyse complète des cellules et bien remuer le lysat pour homogénéiser la dissolution du produit de réaction dans le puits. Les plaques sont ensuite lues à 570 nm avec un filtre de référence à 690 nm.

### **B. RESULTATS ET DISCUSSION**

**B.1 Identification de séquences peptidiques contenant des sites de liaison de protéines codées par deux agents pathogènes (VIH-1 et *T.parva*) avec des PP2A (PP2A1 et sous-unité A).**

Les résultats obtenus après l'incubation des membranes contenant les peptides recouvrant les séquences de Vpr de VIH-1 et CK2 $\alpha$  de *T.parva* avec l'holoenzyme PP2A trimérique purifiée ont permis de déterminer cinq séquences de peptides de Vpr et de CK2 $\alpha$  capables de lier spécifiquement PP2A et présentées dans le tableau ci-après :

**Tableau 1 Séquences peptidiques contenant des sites de liaison de HIV-1-Vpr et CK2 $\alpha$  avec les PP2A**

|  |               | <b>Sous-unité A</b>            | <b>PP2A1</b>     |
|--|---------------|--------------------------------|------------------|
| <b>HIV-1 Vpr</b>                       | <b>Site 1</b> | RHSRIGIIQQRTRNG                | RHSRIGIIQQRTRNG  |
|  | <b>Site 2</b> | VEALIRILQQLFIHFRI              |                  |
| <b>T.parva Ck2 <math>\alpha</math></b> | <b>Site 1</b> | RKIGRGKFSEVFEG                 | KILRLIDWGLAEFYHP |
|  | <b>Site 2</b> | TVTKDKCVIKILKPVKKKKIKREIKILQNL |                  |
|  | <b>Site 3</b> | KILRLIDWGLAEFYHP               |                  |

Plus précisément, deux séquences peptidiques contenant un site de liaison de Vpr de VIH-1 avec la protéine PP2A1 (Fig.1B. "site 1") et avec la sous-unité A (Fig.1A "site 1" et "site 2") ont été identifiées. Trois séquences peptidiques contenant un site de liaison de CK2 $\alpha$  de *T. parva* avec la protéine PP2A1 (Fig.2B "site 3") et avec la sous-unité structurale A ont aussi été identifiées (Fig.2A "site 1", "site 2" et "site 3").

#### **B.2 Intérêt de l'utilisation des peptides de Vpr de VIH-1 qui lient PP2A**

L'expression, exogène ou due à l'infection provirale, de Vpr de VIH-1 induit l'apoptose des cellules HeLa, des lignées lymphoïdes T et des lymphocytes primaires (Stewart *et al.*, 1997 *J Virol* 71: 5579-9). L'utilisation de mutants Vpr a dans un premier temps permis de corréler cet effet à l'arrêt des cellules en phase G2 du cycle cellulaire. Plus récemment on a

montré que Vpr peut aussi induire l'apoptose indépendamment de l'arrêt en G2 (Nishizawa *et al.* 2000 *Virology* 27: 16-26).

Il a été rapporté que l'activation de PP2A après interaction avec la protéine adénovirale E4orf4, induit l'apoptose dans les cellules transformées (Shtrichman R *et al.*, 2000 *Oncogene* 19: 3757-3765). De façon analogue l'expression de Vpr induit aussi l'apoptose dans les cellules transformées (Stewart *et al.* 1999, *PNAS* 96: 12039-12043).

Par ailleurs, l'analyse des mutants de Vpr connus dans l'état de la technique indique que les peptides identifiés par le procédé de l'invention et liant spécifiquement la protéine PP2A, contiennent des séquences qui corrélerent avec celles requises pour l'effet pro-apoptotique de Vpr.

Ainsi, les fragments des protéines virales, Vpr et E4orf4 qui interagissent avec PP2A et identifiés par le procédé de l'invention pourraient être utiles pour induire l'apoptose des cellules tumorales.

Les peptides identifiés sont aussi naturellement utiles dans l'inhibition de l'infection par le VIH, voire d'autres virus et rétrovirus apparentés.

### **B.3 Intérêt de l'utilisation des séquences de CK2 $\alpha$ de *T.parva* qui lient PP2A**

L'utilisation de l'acide okadaïque et de l'antigène petit t de SV40 a permis de démontrer que la PP2A contrôle la prolifération cellulaire via une nouvelle cascade de phosphorylations impliquant la PI3-kinase, la PKC  $\xi$  (identifiée comme une MAP-Kinase-Kinase-Kinase ou MEKK), la protéine MEK et les deux MAP-Kinases ERK-1 et ERK-2 et les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et Sp1 (Sontag, E., Sontag, J.M., Garcia, A. (1997). *EMBO J.*, 16, 5662-5671; Ayllón, V., Martínez-A., C., Garcia, A., Cayla, X. and Rebollo, A (2000). *EMBO J.* 19, 1-10, A.Garcia, S.Cereghini., E.Sontag (2000). *J.Biol Chem.* 275 :9385-9389). Par ailleurs le rôle de PP2A dans la

régulation de la cascade des MAP-kinases a aussi été suggéré par les travaux de l'équipe de Chambaz (Hériché *et al.* (1997), *Science*, **276**: 952-955) qui ont montré que la surexpression de la sous-unité CK2 $\alpha$  cellulaire active PP2A qui déphosphoryle la protéine Mek.

5 Les travaux de Ole-Moi et coll. (*EMBO J.* (1993) **12**: 1621-1631) ont montré que la transformation par *Theileria* induit une hyperphosphorylation des protéines de l'hôte. Cet effet est en partie dû à l'activation constitutive de la CK2 cellulaire qui serait elle même dépendante de l'action d'une sous  
10 unité de type CK2 $\alpha$  codée par le parasite et sécrétée dans le cytosol de la cellule transformée.

Comme indiqué ci-dessous, la comparaison des séquences identifiées par le procédé de l'invention correspondant aux trois sites de liaison avec PP2A permet d'identifier la présence d'un motif du type: K-I-G/L-R/K qui est partiellement répété dans le site 2

15 Site 1 : **KIGR**

Site 2 : **KILKPVKKKKIKREKILQNL**,

Site 3 : **KILRLI** (duplication partielle KIL/RLI).

Il est intéressant de noter que le site de liaison de l'ATP de CK2 $\alpha$  recouvre partiellement le site 1 et le site 2, ce qui suggère une inhibition de  
20 l'activité kinase après interaction de CK2 $\alpha$  avec la sous-unité A. Par ailleurs, comme on peut le constater dans le tableau 2 ci-après, les trois séquences contenant les sites de liaison de CK2 $\alpha$  de *T. parva* avec PP2A sont conservées parmi plusieurs espèces comprenant les parasites *P.Falciparum* et *Leishmania*.

**Tableau 2** Comparaison des diverses séquences de CK2  $\alpha$  avec les peptides de *T.parva* contenant les sites de liaison avec PP2A (les séquences de *P.falciparum* sont déduites d'une EST, les autres viennent de la Banque génomique « Swissprot »). Seuls les résidus qui diffèrent de la séquence de *T. parva* sont indiqués.

### Site 1

*T.parva* /*Leishmania* R KIGRGKFSEV FEG

*Pfalciparum*/Bovine/Dictyo ■

### Site 2

*T.parva* TVTK D K C VIKI LKPVKKKKIKREIKI LQNL

*Pfalciparum* ■ C ■ ■ ■ A V

Bovine N N- E V ■

*Leishmania* NN ■ ■ V V V ■

*Leishmania* ■ V ■ ■ Q V - L ■ ■ ■ T

Dictyo

### Site 3

*T.parva* K I L RLIDWGLAEFYH P

*Leishmania* ■ ■ ■ I

*Pfalciparum* R Q ■

Bovine R ■

Dictyo ■ ■ ■

L'analyse fine des interactions suggère que les CK2 $\alpha$  de ces différentes espèces devraient interagir avec PP2A; par exemple le peptide 131 de CK2 $\alpha$  de *T.parva* décrit à la figure 2 et dans lequel les quatre premiers acides aminés du site 3 sont délétés est capable de lier PP2A. Ceci suggère que les CK2 $\alpha$  de *Leishmania*, de *P.falciparum* qui diffèrent pour les 3 premiers acides aminés devraient lier PP2A. Ceci est consistant avec le fait que le motif KILRLI présente une duplication de K/R-II/L-I/L qui, dans un contexte basique, pourrait être un site de liaison pour PP2A.

La présence, à l'intérieur de la cellule de ces peptides, correspondant aux sites de liaison *in vivo* des protéines avec PP2A, pourrait donc contrarier le développement de ces parasites.

#### **B.4 Effets biologiques des composés peptidiques selon l'invention sur les cellules**

Les divers peptides listés dans le tableau 3 ont été synthétisés sous forme biotinylés, purifiés par HPLC (Neosystem) et leur effet sur la pénétration intracellulaire et viabilité cellulaire a été analysé dans les cellules Hela. L'étude de l'ensemble des peptides repertoriés dans le tableau 1 a permis de déterminer six peptides qui ont la possibilité de pénétrer dans la cellule cellule Hela (Fig.3).

-Fd6 : un peptide de 12AA dérivé d'un site d'interaction de la sous-unité A de PP2A avec la protéine CK2 $\alpha$  de *T.parva*.

-Fd7 : un peptide de 18AA correspondant à trois répétitions d'un hexa motif de 6AA ; cette séquence, dérivée de la CK2 $\alpha$  de *P.Falciparum*, est homologue à la séquence de *T. parva* qui lie PP2A.

-Fd8 : un peptide dérivé de la protamine (un activateur connu de PP2A).

-Fd11 : un peptide de 18AA correspondant à trois répétitions d'un hexa motif de 6AA dérivé de la séquence de FD14.

-Fd14 : FD14 qui reproduit le site de liaison que nous avons caractérisé de HIV-1 Vpr avec PP2A.

- 5 -Fd13 : Ce peptide correspond à une séquence de HIV-1 Vpr qui est homologue à la séquence du peptide FD14 qui représente un site de liaison avec PP2A avec un autre HIV-1 Vpr.

10 Par ailleurs, les études de viabilité effectuées sur l'ensemble des peptides répertoriés dans le tableau 1 a permis d'identifier trois peptides qui inhibent la viabilité des cellules Hela.

-Fd8 : affecte la viabilité des cellules Hela (Figure 4A)

-Fd14 : affecte clairement la viabilité des cellules Hela (Figure 4B)

15 -Fd12 : un peptide de 18AA dont la séquence dérive de celle du peptide FD11 (Le R est muté en A). Ce peptide qui est homologue à la protéine glucosamine transférase de *Chlamydia muridarum* affecte la viabilité de la cellule Hela (figure 4C). Cet effet biologique pourrait être dû à une interaction avec la membrane plasmique.

**Tableau 3 : Peptides mimant des sites de liaison de protéines cibles avec des PP2A**

| Protéines d'origine          | Code peptides | Séquences peptides | Seq ID NO:    |
|------------------------------|---------------|--------------------|---------------|
| CD28                         | FD2           | -PRRPGPTRKHY       | Seq ID NO:132 |
|                              | FD3           | -(PRRPGPTRK)2      | Seq ID NO:133 |
| CK2 $\alpha$ <i>T. parva</i> | FD6           | -VKKKKIKREIKI      | S q ID NO: 20 |

| Protéines d'origine  | Code peptides | Séquences peptides                  | Seq ID NO:    |
|--|---------------|-------------------------------------|---------------|
| CK2 $\alpha$<br><i>P.Falciparum</i><br>(analogue<br><i>T.parva</i> ) | FD7           | -(RQKRLI)3                          | Seq ID NO:134 |
| Vpr (HIV-1)  | FD9           | -RHSRIG                             | Seq ID NO:135 |
|  | FD10          | -(RHSRIG)2                          | Seq ID NO:136 |
|  | FD11          | -(RHSRIG)3                          | Seq ID NO:137 |
|  | FD12*         | -(AHSRIG)3<br>(FD11 mutation R- -A) | Seq ID NO:138 |
|  | FD13          | RHSRIGVTRQRRARNG<br>(analogue FD14) | Seq ID NO:139 |
|  | FD14          | RHSRIGIIQQRRTNG                     | Seq ID NO:2   |
| Protamine  | FD8           | RRRRRRRSRGRRRTY                     | Seq ID NO:140 |

## Discussion

Les peptides issus de certaines protéines qui interagissent avec des PP2A : une nouvelle approche anti-tumorale ?

- 5 Notre étude a permis d'identifier deux peptides pénétrants (FD8 /FD14) dérivés de deux protéines ,Vpr et protamine, connues pour interagir avec des PP2A. Ces peptides qui ont en commun des séquences riche en Argine ou en lysine, pourraient donc pénétrer dans la cellule en utilisant un mécanisme général d'internalisation. Un tel mécanisme, commun pour
- 10 l'internalisation des peptides ayant des séquences riche en Argine, a été récemment proposé (Tomoki Suzuki, *et al*/(2002), Possible Existence of Common Internalization Mechanisms among Arginine-rich P ptid s, JBC 277:2437-2443). De façon générale la présence de séquences riches en Argine ou en lysine caractérise les protéines liant la PP2A ce qui suggère

que d'autres peptides pénétrants pourraient être identifiés dans la famille des PP2A.

Vpr, une protéine codée par le virus VIH-1, est impliquée dans le maintien d'une charge virale élevée et dans l'établissement de la pathogenèse liée au VIH. L'expression de Vpr, exogène ou due à l'infection provirale de HIV-1, induit l'apoptose dans des cellules HeLa, dans des lignées lymphoïdes T, dans des lymphocytes primaires et dans les cellules transformées (Stewart *et al.* J Virol 1997 ; 71 : 5579-9 ; Stewart *et al.* 1999, PNAS, 96, 12039-12043). Par ailleurs il a été rapporté que l'interaction de PP2A avec une autre protéine virale, Adenovirus E4orf4 (Marcellus *et al.* J Virol. (2000) 74:7869-7877) peut induire l'apoptose des cellules tumorales. Au total ces résultats suggèrent l'hypothèse que l'activation de certaines PP2A serait un nouveau moyen d'induire l'apoptose des tumeurs. Dans ce sens, nos résultats présentés à la figure 4B suggèrent que le peptide F14 dérivé de HIV-1 Vpr pourrait représenter un biopeptide anti-tumoral. L'absence d'effet biologique du peptide FD13 (dont la séquence diffère de quatre AA par rapport à FD14-tableau 2) suggère que la structure de FD14 est critique pour réguler la viabilité de Hela. Par conséquent, l'obtention de molécules chimiques mimant la structure du peptide FD14 pourrait donc permettre de générer de nouvelles substances anti-tumorales.

## REVENDICATIONS

- 5 1. Peptide d'une taille inférieure à 30 acides aminés, de préférence inférieure à 20 acides aminés, caractérisé en ce qu'il lie *in vitro*, de manière spécifique, une holoenzyme protéine phosphatase de type 2A ou l'une de ses sous-unités.
- 10 2. Peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un fragment d'une protéine virale, parasitaire ou cellulaire, ladite protéine liant *in vitro* la protéine phosphatase de type 2A, ou d'une séquence se distinguant du fragment de protéine précédent par substitution ou délétion d'acides aminés, ladite séquence distincte conservant néanmoins les propriétés de liaison à la protéine phosphatase de type 2A ou l'une de ses sous-unités.
- 15 3. Peptide selon la revendication 2 caractérisé en ce ladite protéine virale, parasitaire ou cellulaire est choisie parmi les séquences suivantes : antigène t de SV40 ou de polyôme, antigène moyen t de polyôme, sous unité de PP2A de type B (B, B', B''), CXCR2 (récepteur de chemokine), CK2 $\alpha$ , CaMIV, p70S6-kinase, Pak1/Pak3, Tap42/alpha 4, PTPA, Set/11/12-PP2A, E4orf4, *tau*, CD28 ou *Vpr*.
- 20 4. Peptide selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un fragment de la protéine CD28 choisi parmi l'une des séquences peptidiques suivantes :
  - (a) PRRPGPTRKHY (SEQ ID NO :132), ou,
  - (b) une séquence se distinguant de la séquence visée en
    - 25 (a) par substitution ou délétion d'acides aminés, ladite séquence conservant néanmoins les propriétés de liaison à la protéine phosphatase de type 2A ou l'une de ses sous-unités.
- 30 5. Peptide selon la revendication 3 caractérisé ce que ladite protéin virale, parasitaire ou cellulaire est la protéine *Vpr* du virus VIH.

6. Peptide selon la revendication 5 caractérisé en ce ladite protéine *Vpr* est issue du virus VIH-1 ou VIH-2.

7. Peptide selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi l'une des séquences peptidiques suivantes :

5

(a) RRRRRRRSRGRRRRRTY (SEQ ID NO :140); ou,

(b) une séquence se distinguant de la séquence visée en

(a) par substitution ou délétion d'acides aminés, ladite séquence conservant néanmoins les propriétés de liaison à la protéine phosphatase de type 2A ou

10

l'une de ses sous-unités.

8. Peptide selon la revendication 6 caractérisé en ce qu'il est inclus dans l'une des séquences suivantes :

a) VEALIRILQQLLFHFRI (SEQ ID NO :1),

b) RHSRIGIIQQRTRNG (SEQ ID NO:2), ou

15

une séquence se distinguant de SEQ ID NO :1 ou SEQ ID NO :2 par substitution ou délétion d'acides aminés, ladite séquence distincte conservant néanmoins les propriétés de liaison pour la protéine phosphatase de type 2A ou l'une de ses sous-unités.

9. Peptide selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il s'agit de la séquence RHSRIGVTRQRRARNG (SEQ ID NO :139).

20

10. Peptide selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il consiste en la séquence RHSRIG (SEQ ID NO :135).

11. Peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 caractérisé en ce que son administration induit l'apoptose des cellules tumorales.

25

12. Peptide selon la revendication 3 caractérisé en ce que ladite protéine virale, parasitaire ou cellulaire est la protéine CK2 $\alpha$ .

13. Peptide selon la revendication 12 caractérisé en ce que ladite protéine CK2 $\alpha$  est issue du parasite *Theileria parva*.

14. Peptide selon l'une des revendications 12 ou 13 caractérisé en ce que son administration réduit le développement parasitaire.

15. Peptide selon l'une quelconque des revendications 12 à 14, caractérisé en ce qu'il est inclus dans l'une des séquences suivantes :

- a) RKIGRGKFSEVFEG (SEQ ID NO :3),
- b) TVTKDCVIKILKPVKKKKIKREIKILQNL (SEQ ID NO: 4),
- c) KILRLIDWGLAEFYHP (SEQ ID NO: 5), ou,
- d) Une séquence homologue de SEQ ID NO :3, SEQ ID NO :4 ou SEQ ID NO :5 dérivée de *P. falciparum* ou *leishmania*, ou,

une séquence se distinguant des séquences mentionnées ci-dessus par substitution ou délétion d'acides aminés, ladite séquence distincte conservant néanmoins les propriétés de liaison à la protéine phosphatase 2A ou l'une de ses sous-unités et notamment la séquence TVTKDKCVIKILKPVKKKKIKREIKILQNL.

16. Peptide selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il s'agit du peptide RQKRLI (SEQ ID NO :141).

17. Peptide selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce qu'il inhibe, de manière compétitive, l'interaction de la protéine native dont il est issu avec une holoenzyme PP2A ou l'une de ses sous-unités.

18. Peptide selon l'une des revendications 1 à 17, caractérisé en ce qu'il est couplé à un vecteur capable de transférer ledit peptide dans une cellule eucaryote.

19. Polypeptide caractérisé en ce qu'il est constitué de la répétition d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 13.

20. Polypeptide selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi l'une des séquences suivantes :

- (a) (RHSRIG)<sub>2</sub> (SEQ ID NO :136);
- (b) (RHSRIG)<sub>3</sub> (SEQ ID NO:137);ou,
- (c) (RQKRLI)<sub>3</sub> (SEQ ID NO:134).

21. Polynucléotide caractérisé en ce que sa séquence consiste en la séquence codante d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 20.
- 5 22. Polynucléotide caractérisé en ce que sa séquence est choisie parmi l'une des séquences suivantes SEQ ID NO : 26 , NO : 27, NO : 28, NO : 29 ou NO : 30.
23. Polynucléotide caractérisé en ce qu'il consiste en un multimère du polynucléotide selon la revendication 21 ou 22.
- 10 24. Vecteur d'expression cellulaire, caractérisé en ce qu'il comporte un polynucléotide selon l'une des revendications 21 à 23 et des séquences régulatrices permettant l'expression d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 20 dans une cellule hôte.
- 15 25. Anticorps purifié polyclonal ou monoclonal caractérisé en ce qu'il est capable de lier de façon spécifique l'un quelconque des peptides selon l'une des revendications 1 à 20.
26. Composition pharmaceutique comprenant l'un des peptides selon l'une des revendications 1 à 20 en combinaison avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
- 20 27. Composition pharmaceutique comprenant un des éléments choisis parmi un polynucléotide selon l'une des revendications 21 à 23, un vecteur d'expression selon la revendication 24 ou un anticorps selon la revendication 25.
28. Peptide, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi l'une des séquences suivantes :
- 25 - SEQ ID NO:137;  
- SEQ ID NO:139;  
- SEQ ID NO:140.
29. Peptide caractérisé en ce qu'il s'agit de la séquence SEQ ID NO :20.

30. Utilisation d'un peptide ou polypeptide défini selon l'une des revendications 1 à 20, 28 ou 29, dans la préparation d'un médicament utile dans le traitement d'une infection virale ou parasitaire.

5 31. Utilisation d'un peptide ou polypeptide défini selon l'une des revendications 5 à 10, 28 ou 29, dans la préparation d'un médicament apte à inhiber l'infection au VIH.

10 32. Utilisation d'un peptide défini selon l'une des revendications 5 à 20 ou 28, dans la préparation d'un médicament apte à induire l'apoptose de cellules cibles, et en particulier de cellules tumorales.

33. Utilisation d'un peptide défini selon l'une des revendications 12 à 16, dans la préparation d'un médicament apte à inhiber l'infection parasitaire.

15 34. Utilisation d'un peptide défini selon l'une des revendications 12 à 16, dans la préparation d'un médicament utile dans le traitement du paludisme.

35. Utilisation d'un polynucléotide selon l'une des revendications 21 à 23 ou d'un anticorps selon la revendication 25 dans le diagnostic *in vitro* de pathologies parasitaires ou virales.

20 36. Méthode d'identification d'un peptide dont la séquence est issue d'une protéine virale, parasitaire ou cellulaire, ledit peptide liant spécifiquement une holoenzyme protéine phosphatase de type 2A ou l'une de ses sous-unités, ladite méthode comprenant les étapes consistant à :

25 a) déposer sous forme de spots, sur un support, des peptides dont la séquence est issue d'une protéine virale, parasitaire ou cellulaire, chaque spot correspondant au dépôt d'un peptide de séquence définie,

30 b) mettre en contact le support solide avec une solution contenant l'holoenzyme protéine phosphatase 2A ou l'une d

ses sous-unités, dans des conditions permettant aux peptides présents sur le support, de lier l'holoenzyme ou l'une de ses sous-unités, et,

c) à identifier sur le support solide, le peptide sur lequel se fixe la protéine phosphatase 2A ou l'une de ses sous-unités.

37. Méthode selon la revendication 36 caractérisée en ce que les peptides déposés sous forme de spot sont d'une taille inférieure à 20 acides aminés, de préférence inférieure à 15 acides aminés.

38. Méthode selon l'une quelconque des revendications 36 ou 39 caractérisée en ce que les peptides sont déposés sur une membrane de cellulose.

39. Méthode selon l'une quelconque des revendications 36 à 40 caractérisée en ce que l'ensemble des peptides déposés recouvre la séquence complète de la protéine virale, parasitaire ou cellulaire dont les séquences sont issues.

40. Méthode de préparation d'un peptide tel que défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, 28 ou 29, comprenant la transformation d'un hôte cellulaire à l'aide d'un vecteur d'expression cellulaire tel que défini à la revendication 24, suivi de la mise en culture de l'hôte cellulaire ainsi transformé, et la récupération du peptide dans le milieu de culture.